Strahlenbiologisches Institut der Universität Zürich
(Frau Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli)

Arbeit unter Leitung von Dr. K.R. Rao

Strahlensensibilisierende Wirkung von Ro 07-0582 auf Ehrlich Ascites Carcinomzellen in vivo: Analyse der Regression normaler und künstlich anoxischer Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

VERENA VÉCSEY-MOSIMANN
von Zürich (ZH)

Genehmigt auf Antrag von Frau Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli

Juris Druck + Verlag Zürich
1979

Strahlenbiologisches Institut der Universität Zürich
(Frau Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli)

Arbeit unter Leitung von Dr. K.R. Rao

Strahlensensibilisierende Wirkung von Ro 07-0582 auf Ehrlich Ascites Carcinomzellen in vivo: Analyse der Regression normaler und künstlich anoxischer Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

VERENA VÉCSEY-MOSIMANN
von Zürich (ZH)

Genehmigt auf Antrag von Frau Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli

Juris Druck + Verlag Zürich
1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ISBN 3 260 0607 0

Inhaltsverzeichnis

Einführung	1
Bedeutung des Sauerstoffs für die Strahlenwirkung	1
Möglichkeiten zur Herabsetzung der Strahlenresistenz hypoxischer Tumorzellen	4
Material und Methoden	6
Resultate	9
Diskussion	11
Zusammenfassung	15
Tabellen und graphische Darstellung	16
Literaturverzeichnis	20

Einführung

In die komplexen Vorgänge, welche durch die Einwirkung ionisierender Strahlen auf die organische Materie ausgelöst werden, konnten vornehmlich in den letzten 30 Jahren durch die strahlenbiologische Grundlagenforschung Einblicke gewonnen werden, welche auch in der klinischen Anwendung zu Fortschritten führten, so die Einführung dicht ionisierender Strahlen oder die Erprobung von Strahlensensibilisatoren in der Krebstherapie. - Auf einige wesentliche Aspekte der Strahlenwirkung möchte ich nachfolgend näher eingehen. Insbesondere die Rolle des Sauerstoffs in der strahlenbiologischen Wirkungskette, die Problematik der relativen Strahlenresistenz der hypoxischen Tumorzelle, welche entscheidend die lokale Tumorkontrolle beeinflussen kann, und die Möglichkeiten zur Lösung dieses Problems sollen genauer erläutert werden. Die geschichtliche Entwicklung und die Wirkungsweise der sauerstoffimitierenden Substanzen, der sogenannten elektronenaffinen Strahlensensibilisatoren, werden besprochen und die bisherigen Forschungsergebnisse der zurzeit wichtigsten Verbindung, des Ro o7-o582, mit meinen Versuchsresultaten verglichen.

Bedeutung des Sauerstoffs für die Strahlenwirkung

Das Ausmass des Strahlenschadens kann von der Anwesenheit von Sauerstoff während der Bestrahlung abhängen, indem der Schaden zumeist verstärkt wird. Dieser sogenannte "Sauerstoffeffekt" dürfte auf verschiedenen Mechanismen beruhen, welche je nach Reaktionssystem und Kriterium unterschiedlich sind.

Die Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Zustand des Zellstoffwechsels, z.B. von der Blutversorgung eines Gewebes, ist seit langem bekannt (Holthusen 1921, Mottram 1936). Crabtree und Cramer erkannten bereits 1934, dass die Sauerstoffkonzentration wesentlich an der Strahlensensibilität beteiligt ist. Versuche von Anderson und Turkowitz (1941) und von Thoday und Read (1947) bestätigten diese Auffassung. Durch die Arbeiten von L.H. Gray und seiner Schule wurde die Bedeutung des Sauerstoffeffekts auch als grundlegendes Phänomen

in der klinischen Anwendung anerkannt. Anhand histologischer Untersuchungen am menschlichen Bronchuscarcinom konnten Thomlinson und Gray (1955) zeigen, dass die Präsenz hypoxischer Zellen in Tumoren unter anderem bestimmt wird durch Metabolismus und Diffusionskapazität des Sauerstoffs. Hypoxische Zellen müssen dort anzutreffen sein, wo die Entfernung zu den nächsten Kapillaren mehr als 200 μm beträgt. Durch das dem Tumorgewebe inhärente ungesteuerte Wachstum und der damit nicht Schritt haltenden Vascularisierung resultiert das hauptsächlich tumorgebundene Vorhandensein solcher hypoxischer Zellbezirke. Eine Vielzahl von Untersuchungen konnte bisher die dosismodifizierende Wirkung des Sauerstoffs auf die Strahlenschädigung von normalen oder von Tumorzellen aufzeigen, z.B. Hewitt und Wilson (1959), Deschner und Gray (1959).

Der Sauerstoff muss während der Bestrahlung anwesend sein, um seine strahlensensibilisierende Wirkung, welche offenbar mit den frühen Vorgängen bei der Energieübertragung in Zusammenhang steht, ausüben zu können. Es wird heute angenommen, dass hauptsächlich die Reaktionsprodukte des bestrahlten Wassers, $H^{\bullet}$- und $OH^{\bullet}$-Radikale, den Ausgangspunkt der strahlenbiologischen Wirkungskette bilden (Weiss 1944, Lea 1947, Ebert 1955), die sich ihrerseits rekombinieren und aktive Sekundär- und Tertiärprodukte (Peroxide) bilden, welche wichtige Reaktionen im bestrahlten Gewebe auslösen. Die Ionisationsdichte der Strahlung scheint von Bedeutung, indem dicht ionisierende Strahlen mit ihrer räumlich konzentrierten Energieabgabe zu einer Anhäufung von Radikalen führen, welche unter sich reagieren und auch in Abwesenheit von Sauerstoff zur Bildung stabiler Peroxide führen. Bei der dünn ionisierenden Strahlung begünstigt hingegen die Anwesenheit von Sauerstoff die Peroxidbildung, vor allem durch die Reaktion mit den vorhandenen $H^{\bullet}$-Radikalen.

Das Ausmass der definitiven Strahlenschädigung wird aber nicht nur durch den primär bewirkten Strahlenschaden am biologischen Substrat sondern in hohem Masse auch durch die Erholungskapazität des Gewebes bestimmt (z.B. Elkind und Sutton, 1960). Die verschiedenen Repairmechanismen wiederum werden entscheidend von der Energieversorgung der Zellen beeinflusst. Nach Pohlit (1976) muss für die sofort ablaufenden Repairmechanismen (recovery from sublethal damage) ein Pool unmittelbar verwertbarer Energie (ATP) zur Verfügung stehen. Milieuveränderun-

gen während der Bestrahlung können diesen raschen Repair beeinflussen. Bei gut mit Nährstoffen (O_2) versorgten Zellen gehen auch unter der Bestrahlung die energieverbrauchenden Stoffwechselvorgänge weiter, die Zelle verarmt an gehorteter Energie. Der strahlensensibilisierende Effekt des Sauerstoffs kann zum Teil auf der Hemmung dieses unmittelbaren Repairs durch anderweitige metabolische Beanspruchung des Energiepools der Zelle beruhen (Fritz-Niggli und Michel, 1970). Auch die langsamer ablaufenden Repairvorgänge (repair from potentially lethal damage) sind vom Energiestoffwechsel der Zelle abhängig. Sie können durch Milieuveränderungen nach der Bestrahlung modifiziert werden, wobei wahrscheinlich enzymatische Prozesse eine Rolle spielen. - Die Tumorzelle unterscheidet sich in ihrem Energiestoffwechsel grundlegend von normalen Zellen (Warburg, 1955). Sie ist arm an Mitochondrien, den Trägern der Atmungskettenphosphorylierung. Sie gewinnt ihre Energie nicht wie normale Zellen aus der Atmung sondern vornehmlich aus der Glycolyse. Da die respiratorischen Reaktionen eine viel höhere Ausbeute an energiereichem Phosphat liefern, kann die normale, atmende Zelle im allgemeinen den zum Repair benötigten zusätzlichen Energiebedarf besser gewährleisten als die glycolysierende Tumorzelle. (Was aber nicht heissen will, dass nicht auch über glycolytische Stoffwechselvorgänge Energie bereitgestellt werden kann. Unter Umständen kann eventuell die Tumorzelle gerade aufgrund ihrer Unabhängigkeit vom relativ strahlensensiblen, strukturgebundenen Repairsystem der Atmungskettenphosphorylierung besser befähigt sein zur Reparatur des Strahlenschadens (Fritz-Niggli, 1968).)

Nach einer Bestrahlung können die Oxygenierungsverhältnisse im Tumorgewebe während einer gewissen Zeit verbessert werden, da die der Strahlenschädigung folgende kurzfristige Abnahme der Wachstumsrate des Tumors (bedingt durch Verzögerung der Zellzyklusprogression und Zelltod) vorübergehend eine bessere Nährstoffversorgung der überlebenden Zellen erlaubt. Thomlinson (1968) prägte für diesen Vorgang den Begriff der Reoxygenierung. Dieser Reoxygenierungseffekt ist neben Erholungsvorgängen und Veränderungen der Zellkinetik und der Proliferationsrate von grosser Bedeutung bei der fraktionierten Bestrahlung.

Die obigen Ausführungen versuchen, einen Einblick in die komplizierten Wechselwirkungen zu geben, welche bei einer fraktionierten Bestrahlung die Ueberlebensrate von Zellen in Normalgeweben oder Tumoren bestimmen können. Die Rolle des Sauerstoffs ist dabei keineswegs so eindeutig, er kann nicht nur als Strahlensensibilisator sondern unter Umständen auch als Strahlenprotektor wirken (Littbrand und Révész, 1969). Alle diese Vermutungen wirkten aber als potentes Stimulans in der Entwicklung der verschiedensten Methoden, welche in der klinischen Anwendung eine Verbesserung der strahlentherapeutischen Resultate bringen sollten.

Möglichkeiten zur Herabsetzung der Strahlenresistenz hypoxischer Tumorzellen

a) Durch verbesserte, im günstigsten Fall für jeden speziellen Tumor fast "massgeschneiderte" Fraktionierungsschemata sollen auch die primär hypoxischen Zellen infolge der Reoxygenierung ihre Strahlenresistenz verlieren.

b) Eine andere Methode besteht in der Bestrahlung des Patienten unter Sauerstoffüberdruck (Churchill-Davidson, 1955). Das Verfahren ist aber sehr aufwendig und der therapeutische Gewinn nicht eindeutig sichtbar.

c) Die Tatsache, dass der Sauerstoffeffekt mit zunehmender Ionisationsdichte der Strahlung an Bedeutung verliert (Ebert 1955, Conger 1956), gab der radiobiologischen Erforschung und klinischen Erprobung von Hoch-LET-Strahlen (LET = Linearer Energie-Transfer) neue Impulse (Fowler et al., 1963). Die Resistenz hypoxischer Zellen kann bei der Anwendung dicht ionisierender Strahlen weitgehend aufgehoben werden, und auch die geringere Erholungsfähigkeit des Gewebes nach Hoch-LET-Bestrahlung kann unter Umständen, je nach Reaktionssystem, die Neutronenbestrahlung gegenüber der locker ionisierenden Strahlung in der Tumortherapie bevorzugen. Es ist dies heute eines der faszinierendsten Gebiete in der Entwicklung der Radiotherapie, doch darf der enorme technische und finanzielle Aufwand, der damit verbunden ist, nicht ausser acht gelassen werden. Eine klinische Anwendung wird auch in Zukunft nur in wenigen hochspezialisierten Zentren möglich sein.

d) Gerade unter dem Gesichtspunkt der kostenniedrigen und weltweit möglichen Anwendung ist das Interesse der Forschung seit langem auf die Entwicklung und Erprobung von chemischen Substanzen gerichtet, welche zu einer verstärkten

Strahlenwirkung im Tumorgewebe führen, den sogenannten Strahlensensibilisatoren. Ein naheliegender Angriffspunkt dieser Strahlensensibilisatoren musste die hypoxische Tumorzelle sein. 1963 stellten Adams und Dewey das Postulat auf, dass bestimmte Substanzen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaft als Elektronenakzeptoren die Rolle des Sauerstoffs bei den Primärvorgängen nach Absorption der Strahlenenergie übernehmen können. In der Folgezeit wurden, hauptsächlich an Versuchen an Bakterienzellsystemen, die verschiedensten Substanzen wie Diketone, Chinone, aromatische Ketone und verschiedene Nitroverbindungen gefunden, welche alle die Strahlensensibilität der hypoxischen Zellen erhöhten, in Anwesenheit von Sauerstoff hingegen keine Wirkung zeigten. 1972 konnten Denekamp und Michael den Nachweis der Sensibilisation in vivo erbringen mit einem löslichen Derivat des p-Nitroacetophenons, einer Substanz, welche sich in vitro an Säugerzellen als wirksam erwiesen hatte (Chapman 1971, Adams 1971). Mit der Entdeckung der strahlensensibilisierenden Wirkung des Metronidazols, eines 5-Nitroimidazolderivats, welches als Antitrichomonadenmittel bereits erprobt war (Flagyl^{R}), fand man dann ein Medikament, welches in vivo einen deutlichen sensibilisierenden Effekt aufwies und welches erstmals auch - dank der langen Halbwertzeit - eine klinische Anwendung in Reichweite rückte (Versuche mit Metronidazol in vitro u.a. durch Chapman 1973, Asquith et al. 1973, in vivo durch Begg et al. 1974, Denekamp et al. 1974, Rauth und Kaufman 1974). Die gezielte Suche nach weiteren elektronenaffinen Derivaten des Imidazols führte zu 1(2-OH-3-methoxypropyl)-2-nitroimidazol, bekannt unter der Bezeichnung Ro o7-o582. Dieses Medikament erwies sich in vielen Versuchen in vitro und in vivo als bislang potentester Strahlensensibilisator (ich verweise v.a. auf die Arbeiten, welche vom Forscherteam des Gray Laboratory in London (Sheldon et al. 1974, Denekamp und Harris 1975, McNally 1976, Denekamp et al. 1976, Denekamp et al. 1977) und am Ontario Cancer Research Institute (Rauth et al., 1975) durchgeführt worden sind).

In letzter Zeit wurde vermehrt auf die direkte cytotoxische Wirkung des Ro o7-o582 hingewiesen (Hall und Roizin-Towle 1975, Moore et al. 1976), welche durch metabolische Reduktionsprodukte des Medikaments bedingt sein soll. Auf einige Aspekte und Probleme, insbesondere auf die Bedeutung einer eventuellen Interferenz mit dem zellulären Metabolismus, werde ich in der Diskussion zurückkommen.

Bei den ersten versuchsweisen klinischen Anwendungen konnten zum Teil recht ermutigende Resultate erzielt werden (Dische et al. 1976, Thomlinson et al. 1976). Um einen wirklichen therapeutischen Fortschritt erreichen zu können, müssen aber noch viele offene Fragen gelöst werden, unter anderem auch die genaue Dosis und der Zeitpunkt der Verabreichung des Medikaments. Und nicht zuletzt stellt die in der klinischen Anwendung gravierendste Nebenwirkung, die Neurotoxizität, schwerwiegende Probleme (Dische et al., 1977).

Für die erfolgreiche Anwendung eines auf hypoxische Tumorzellen wirkenden Strahlensensibilisators müssen folgende Kriterien erfüllt sein (Adams, 1973):

1) keine toxische Wirkung aufs Normalgewebe in therapeutischer Dosis
2) selektive Sensibilisierung hypoxischer Zellen
3) langsame Metabolisierung und gute Diffusionskapazität, um auch schlecht vascularisierte Zellbezirke zu erreichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung von Ro o7-o582 anhand der Proliferationsfähigkeit von Ehrlich Ascites Tumorzellen der Maus zu untersuchen, wobei ein besonderes Gewicht auf die Frage gelegt wurde, ob der sensibilisierende Effekt wirklich nur die hypoxischen Zellen betrifft.

Material und Methoden

Die Versuche wurden an 6-10 Wochen alten männlichen NMRI Albino Mäusen (25-35 g) durchgeführt. Alle Tiere erhielten komprimierte Standardnahrung und Wasser ad lib. Je 10 Mäuse wurden in einem Käfig gehalten.

Der verwendete Tumor ist ein hypertriploider Stamm eines Ehrlich Ascites Carcinoms. Er wird durch wöchentliche i.p.-Injektion von 0,2 cc unverdünnter, 7 Tage alter Ascitesflüssigkeit in neue Mäuse aufrechterhalten. Cytologie und Wachstumscharakteristika wurden durch Rao (1973) eingehend untersucht.

Von 2 Mäusen mit 7 Tage alten Kulturen wurde Ascitesflüssigkeit entnommen, gepoolt und mit ungefähr der gleichen Menge eisgekühlter phys. NaCl vermischt. Die Zellzahl wurde mittels eines elektronischen Zählgerätes (Counter Coulter) bestimmt und hierauf mit NaCl die gewünschte Verdünnung hergestellt. Für alle in dieser Arbeit

beschriebenen Experimente wurde für die i.p.-Weiterimpfung auf die neuen Empfängermäuse die gleiche Anzahl von ungefähr 4.10^6 Zellen/0,2cc verwendet um den Ascitestumor zu induzieren. Am 5. auf die Ascitesinocculation folgenden Tag wurden die verschiedenen Behandlungen durchgeführt. Eine Behandlungsgruppe bestand aus 3-4 Mäusen.

Unmittelbar vor Verabreichung wurde die gewünschte Menge Ro o7-o582 unter sterilen Kautelen in phys. NaCl aufgelöst (im ca. 40°C warmen Wasserbad, um die Löslichkeit zu verbessern). Es wurde vorerst eine Dosis von 0,67mg/g KG gewählt, i.p. verabreicht in 1 ml phys. NaCl, in den späteren Versuchen wurde die Dosis reduziert auf 0,35mg/g KG. Das Medikament wurde jeweils 20 min vor der Bestrahlung appliziert. (Da das Medikament in direkten Kontakt zu den Tumorzellen kam, durfte nach dieser Zeitdauer eine optimale Konzentration im Ascitestumor angenommen werden.)

Als Strahlenquelle diente ein klinisches Modell eines Picker Röntgengeräts, 200 kV, 12 mA, 1 mm Al. Dosismessungen sind mit einer Victoreen-Ionisationskammer durchgeführt worden, welche, im verwendeten Plexiglasphantom plaziert, bei einem Fokus-Tisch-Abstand von 28 cm eine Dosisrate von 241 R/min ergab. Zur Bestrahlung wurden je 4 Mäuse in das runde Plexiglasphantom von 10 cm ø gebracht. Die verabreichte Dosis betrug 1000 bzw. 950 R.

Versuchsanordnung

Alle Experimente wurden in zwei parallel laufenden Versuchsreihen durchgeführt:

a) Behandlung am lebenden Tier bei Luftatmung und

b) die entsprechende identische Behandlung, aber unter "Anoxie"-Bedingungen. Diese wurden erreicht durch Abtöten der Tiere (mittels cervicaler Dislokation) 1 h vor der Bestrahlung. Vom Zeitpunkt des Abtötens bis zur Bestrahlung wurden die Tiere bei Zimmertemperatur gehalten.

Der zeitliche Behandlungsablauf, der für alle Versuchsgruppen gleich gehalten war, sah folgendermassen aus:

min 0: Abtöten der Tiere, die der "Anoxie"-Gruppe zugeordnet werden.

min 40: i.p. Injektion des Medikamentes Ro o7-o582. (Medikamentfreie Tiere erhielten keine Behandlung.)

min 60: Bestrahlung. Unmittelbar anschliessend Abtöten der Tiere der aeroben Gruppe.

Als Kontrolle dienten die folgenden Gruppen:

1a) Die Tiere werden für die gleiche Zeitdauer, wie sie für die Bestrahlung benötigt wird, ins Phantom gesperrt. Keine weitere Behandlung. (Ko/Luft)

1b) Abtöten der Tiere. Nach 1 h Ascitesentnahme. (Ko/Anoxie)

2a) 20 min vor Einsperren ins Phantom i.p. Injektion von 0,67 mg Ro o7-o582/g. Keine weitere Behandlung. (Ko/Ro/Luft)

2b) Abtöten, nach 40 min Medikamentapplikation, nach weiteren 20 min Ascitesentnahme. (Ko/Ro/Anoxie)

Die weiteren Behandlungsgruppen gliederten sich folgendermassen auf:

3a) und b) Bestrahlung 1000 R am lebenden bzw. toten Tier. (1000/Luft bzw. 1000/Anoxie)

4a) und b) Medikament (0,67mg/g) mit nachfolgender Bestrahlung 1000 R. (1000/Ro/Luft bzw. 1000/Ro/Anoxie)

Im Verlauf der Untersuchung stellte sich eine Herabsetzung der Medikamentdosis als wünschenswert heraus. Gleichzeitig wurde auch die Bestrahlungsdosis um 50 R reduziert. Es wurden demnach noch die folgenden Gruppen untersucht:

5a) und b) Bestrahlung 950 R am lebenden/toten Tier. (950/Luft bzw. 950/Anoxie)

6a) und b) Medikament (0,35mg/g) mit nachfolgender Bestrahlung 950 R. (950/Ro/Luft bzw. 950/Ro/Anoxie)

Unmittelbar nach Beendigung der Bestrahlung wurden die Tiere der aeroben Versuchsreihe getötet und von allen Tieren die Entnahme der Ascitesflüssigkeit vorgenommen zur Weiterimpfung auf die abschliessenden Testmäuse. Pro Behandlungsgruppe wurde die Ascitesflüssigkeit von 3 Mäusen steril entnommen, gepoolt und mit eisgekühlter phys. NaCl 3x ausgewaschen und 3x zentrifugiert (ca. 1600 Umdrehungen/min während 1 min). Es folgte die Bestimmung der Zellzahl im Counter Coulter und die Herstellung der gewünschten Verdünnung. Pro Behandlungsgruppe wurden je 10 endgültige Testmäuse mit 4.10^5 Zellen/0,2cc i.p. geimpft.

Die Auswertung erfolgte am 9. auf die Impfung folgenden Tag: alle Tiere wurden getötet, die Ascitesflüssigkeit durch mehrmalige gründliche Spülung der Bauchhöhle mit phys. NaCl unter 5%igem K-oxalat-zusatz so vollständig wie möglich gesammelt und die totale Anzahl Zellen pro Tier im Zählgerät bestimmt. Mit Ausnahme der vier Kontrollgruppen und der beiden Gruppen 1000/Ro/Luft bzw. 1000/Ro/Anoxie wurden alle Experimente mindestens zweimal wiederholt. Die Einzelresultate jeder Gruppe wurden gemittelt und mit den Ergebnissen der anderen Gruppen verglichen.

Resultate

a) Wachstum unbestrahlter und mit Ro o7-o582 behandelter Zellen (Tab. 1)

Die Resultate aller vier Kontrollgruppen liegen im gleichen Streubereich. Weder die 1 h dauernde Anoxie noch die Verabreichung des Medikaments zeigen einen Einfluss auf die Zellviabilität. Um für die folgenden bestrahlten Gruppen einen festen Bezugspunkt zu haben, wurden die Einzelwerte aller vier Kontrollgruppen zusammengenommen und gemittelt. Dieser "Kontroll-Mittelwert" diente danm als Ausgangspunkt zur Beurteilung der Zellregression in den weiter untersuchten Gruppen. Die Bezeichnung Kontrollgruppe bezieht sich fortan auf diesen "Kontroll-Mittelwert", der durch die folgenden Zahlen charakterisiert ist:

$\bar{x} = 311.10^6$ Zellen / $s = \pm 10.10^6$ / 95% VB: $(291.5 - 330.5).10^6$ / $n = 36$

wobei: $\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

95% VB = 95% Vertrauensbereich

n = Anzahl Tiere

b) Wachstum mit 1000 R bestrahlter Zellen, mit und ohne Applikation von 0,67 mg/g Ro o7-o582 (Tab. 2)

Eine einmalige Röntgenbestrahlung mit 1000 R am lebenden Tier lässt die Anzahl der Zellen auf 119.10^6 (37% des Kontrollwerts) absinken. Unter "Anoxie"-Bedingungen zeigt sich deutlich der Effekt der relativen Strahlenresistenz: bei der gleichen verabreichten Dosis beträgt die Zellzahl 198.10^6 (61.5% des Kontrollwerts). Zwischen beiden Gruppen kann im t-Test ein signifikanter Unterschied auf dem 1%-Niveau festgestellt werden. Eine Bestrahlung nach vorheriger Ro o7-o582-Injektion ergab sowohl in der aeroben wie in der "Anoxie"-Gruppe ein überraschendes Ergebnis: die Mäuse enthielten praktisch keine Ascitesflüssigkeit. Obwohl die Bauchhöhle anstatt mit 25 nur mit 8-10 ml phys. NaCl ausgewaschen wurde, konnten im elektronischen Zählgerät mit der bislang verwendeten Verdünnung von 1:1000 keine verlässlichen Werte mehr ermittelt werden. Wir mussten die Verdünnung bis auf 1:20 erniedrigen, um auch nur einigermassen akzeptable Zahlenwerte erreichen zu können. Die Genauigkeit der Zellzählung wurde durch die tiefen Werte (10.10^6 bzw. 3% des Kontrollwerts in der

aeroben Gruppe und 5.10^6 bzw. 1,5% in der "Anoxie"-Gruppe) sicher beeinträchtigt. Untereinander dürfen daher die beiden Gruppen nicht mittels eines statistischen Tests verglichen werden, wohl aber mit der Kontrollgruppe und den beiden bestrahlten Gruppen ohne Medikament: Wir finden eine ganz hochgradige Zellschädigung bei Bestrahlung nach vorheriger Ro o7-o582-Verabreichung, welche unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zellen zu sein scheint und die Zellschädigung in der nur bestrahlten aeroben Gruppe um ein Vielfaches übertrifft. Aufgrund dieser Resultate wurde versucht, durch Herabsetzung der Strahlen- wie der Medikamentdosis günstigere Versuchsbedingungen zu erreichen.

c) Wachstum mit 950 R bestrahlter Zellen, mit und ohne Applikation von 0,35 mg/g Ro o7-o582 (Tab. 3)

Nach einmaliger Bestrahlung mit 950 R wurde eine Zellzahl von 109.10^6 Zellen gefunden. Unter "Anoxie" betrug die Zellzahl 153.10^6 Zellen. Es konnte also ebenfalls ein Sauerstoffeffekt nachgewiesen werden, allerdings nur mit $p = 0,05$. Beide Werte der 950 R-Gruppe liegen unter den entsprechenden Werten der 1000 R-Gruppe. Diese Differenz könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass andere Mäuse verwendet werden mussten, welche zwar dem gleichen NMRI-Stamm angehörten und im Alter den bisher verwendeten Tieren entsprachen, in den ersten 2-3 Wochen im Durchschnitt aber ein um ca. 5 g niedrigeres Körpergewicht aufwiesen. Bei der Bestrahlung nach Injektion von 0,35 mg/g Ro o7-o582 zeigte sich in dieser Serie der gleiche Effekt wie in der vorhergehenden: eine ausgesprochene Verminderung der Zellzahl sowohl beim lebend wie beim tot bestrahlten Tier. Die Werte für die aerobe Gruppe betrugen 4.10^6 Zellen, für die "anoxische" Gruppe 5.10^6 Zellen. - Eine zusammenfassende Uebersichtsdarstellung aller Versuche findet sich in Fig. 1.

Es sei noch erwähnt, dass wir bei fast allen mit Ro o7-o582 behandelten Tieren die folgende Beobachtung machen konnten: Die Mäuse werden bereits 5 min nach Medikamentgabe apathisch, sie bleiben auf dem Käfigboden und klettern nicht mehr wie früher am Gitterdach herum. Die Fluchtreaktionen sind viel schwächer. Bisweilen hat man sogar den Eindruck, das Fell verändere sich, es werde struppiger.

Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgelegten Resultate präsentieren sich folgendermassen:

a) Das Medikament Ro o7-o582 zeigt eine ganz ausgesprochene strahlensensibilisierende Wirkung, welche unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zellen zu sein scheint.

b) Auch im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung am lebenden Tier unter Luftatmung ist dieser Sensibilisierungseffekt deutlich nachweisbar.

c) Alleinige Administration des Medikaments während 25-30 min hat keinen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Asciteszellen.

Unsere Ergebnisse bestätigen nicht die in der umfangreichen Literatur beschriebene alleinig sensibilisierende Wirkung von Ro o7-o582 auf hypoxische Zellen (Adams und Dewey 1963, Adams 1970, Fowler und Adams 1976).

Nach der Hypothese von Adams spielt sich der Wirkungsmechanismus von Ro o7-o582 unmittelbar nach Absorption der Strahlenenergie über sehr rasche freie Radikalreaktionen ab, z.B.:

1) Die direkte Strahlenabsorption im Targetmolekül kann zu Ladungsumlagerungen infolge Anregung von Elektronen führen. Substanzen, welche diese Elektronen auffangen, verhindern den intramolekularen Repair durch Ladungsneutralisation.

2) Eine indirekte Schädigung der Targetmoleküle resultiert aus der Fixation der primären Radiolyseprodukte des Wassers ($H^{\bullet}$- und $OH^{\bullet}$-Radikale, $e^{-}.aq$). Die so entstandenen Targetradikale können sich mit dem Sauerstoff zu irreparablen Peroxiradikalen verbinden, oder eben, bei Fehlen desselben, mit dem Sensibilisator, welcher aufgrund seiner Elektroaffinität die Sauerstoffwirkung imitieren kann.

Gemessen an der Konzentration erreichte bislang keiner der hypoxischen Strahlensensibilisatoren auch nur annähernd die dosismodifizierende Wirkung des Sauerstoffs, was aufgrund des hohen Reduktionspotentials des O_2/H_2O-Redoxsystems auch verständlich ist (Wardman, 1977).

Die durch metabolische Reduktion des Medikaments induzierten Reaktionen, die Beeinflussung des intrazellulären Elektronentransportmechanismus und die Entstehung cytotoxischer Intermediärprodukte, fand in den letzten Jahren Beachtung (Biaglow

et al. 1976, Hall und Biaglow 1977). Die Reduktion des Medikaments ist sehr wahrscheinlich an das Vorhandensein von NADPH gebunden, welches vornehmlich durch den glycolytischen und den Pentosephosphatstoffwechsel bereitgestellt wird. Auch Glutathion scheint von Bedeutung, indem durch die Glutathionreduktase reduzierende Aequivalente auf NADP übertragen werden können. Die Unmöglichkeit des Nachweises von reduzierten Formen des Medikaments unter aeroben Bedingungen scheint darauf zu beruhen, dass das erste Intermediärprodukt im Reduktionsvorgang, das Nitroradikalanion, sein Elektron extrem rasch direkt auf den Sauerstoff überträgt. Der Elektronentransportmechanismus über die Atmungskettenfermente der Mitochondrien wird damit kurzgeschlossen, es kommt zur Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung. Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird die Nitrogruppe über die Zwischenstufen des Nitroradikalanions und Nitrosamin zu Hydroxylamin reduziert. Alle diese Substanzen scheinen eine direkte cytotoxische Wirkung aufzuweisen, sie können unter anderem zu Brüchen in der DNS-Kette führen (Olive und McCalla, 1977). Cysteamin übt eine schützende Wirkung aus, sowohl in bezug auf die cytotoxische wie auch auf die strahlensensibilisierende Wirkung: einerseits durch Wegfangen der cytotoxischen Wirkung, indem anstelle der Targetmoleküle die SH-Gruppe des Cysteamins mit den metabolischen Reduktionsprodukten des Sensibilisators reagiert, andererseits durch Bereitstellung reduzierender Aequivalente, welche für den intramolekularen Repair von Bedeutung sind (Hall et al., 1977).

Eine vergleichbare Studie über die strahlensensibilisierende Wirkung von Ro o7-o582 wurde 1977 von Hofer et al. an Ascitestumoren ausgeführt. Durch die i.p. Administration oxygenierter Erythrocyten 5 min vor Behandlung wurde eine möglichst vollständige Oxygenierung der Asciteszellen angestrebt, Anoxieverhältnisse wurden erreicht durch das Abtöten der Tiere 5 min vor Behandlung. Die i.p. Injektion von 0,5 mg/g Ro o7-o582 35 min vor der Bestrahlung sensibilisierte selektiv nur die hypoxischen Zellen. Unter kombinierter Behandlung hypoxischer Zellen mit Hyperthermie (41.5°C) und Ro o7-o582 hingegen konnte eine synergistische Potenzierung der Strahlenschädigung nachgewiesen werden, welche die Strahlenschädigung der unbehandelten, voll oxygenierten Zellen übertraf. (Ueber den Effekt derselben kombinierten Behandlung von oxygenierten Zellen wurden keine Angaben gemacht.) Es wäre eventuell möglich, dass das Alter des behandelten Ascitestumors (bei Hofer Bestrahlung 15-18 h post inocc.) einen Einfluss hat auf das unterschiedliche Resultat, indem der Stoffwechsel von älteren Asciteszellen auf Milieuveränderungen,

wie sie die Administration von Ro o7-o582 darstellt, empfindlicher reagieren könnte.

Bei der Interpretation unserer Resultate stellt sich die Frage nach dem Oxygenierungsgrad des von uns untersuchten Ehrlich Ascites Tumors am Behandlungstag (= Tag 5 der Tumorimplantation). Ascitestumoren haben sehr wahrscheinlich eine einheitlichere Zellpopulation als solide Tumoren, aber auch sie stellen ein Gemisch von Zellen dar. Mit zunehmendem Alter scheinen Ascitestumoren einen rasch ansteigenden Anteil hypoxischer Zellen aufzuweisen (Del Monte, 1967), welche ihren Energiebedarf aus der Glycolyse decken. Die aus zellkinetischen Untersuchungen zu beobachtende Zellzyklusverlängerung bei zunehmendem Alter des Ascitestumors (Lala und Patt 1966, Tubiana 1971) wird von Tannock (1969) unter anderem auf den insuffizienten Energiestoffwechsel der Asciteszellen zurückgeführt. Intraperitoneale O_2-druckmessungen und die Möglichkeit der künstlichen Verbesserung der Sauerstoffversorgung von Ascitestumoren, z.B. durch i.p. Injektion von 0,1 oder 0,2m H_2O_2 (Deschner und Gray 1959, Berry 1968), bestätigen ebenfalls die Annahme einer zunehmend hypoxischen Tumorumgebung bereits bei kleinen Ascitesvolumina von 1-2 ml. Die sensibilisierende Wirkung bei der Bestrahlung nach vorheriger Ro o7-o582-Injektion verglichen mit alleiniger Bestrahlung beim lebenden Tier könnte einerseits dadurch bedingt sein, dass der von uns untersuchte Ehrlich Ascites Tumor auch unter aeroben Verhältnissen einen gewissen Anteil hypoxischer Zellen enthält. Ein zusätzlicher Versuch, bei welchem eine möglichst optimale Oxygenierung des Ascitestumors angestrebt wird, z.B. durch kurz vor der Bestrahlung verabreichte i.p. Injektion von 0,5 ml oxygenierten Erythrocyten (Hofer et al., 1977) oder, wie bereits erwähnt, 0,1 oder 0,2m H_2O_2, könnte Aufschluss geben über einen eventuell vorhandenen hypoxischen Zellanteil in vivo.

Die hochgradige Sensibilisation durch das Medikament Ro o7-o582 in unseren Versuchen scheint uns damit aber noch nicht geklärt. Wir verwendeten hohe Medikamentdosen, 0,67 bzw. 0,35 mg/g, so dass unter Annahme eines Ascitesvolumens von 1 ml am Behandlungstag die direkt auf die Tumorzellen einwirkende Konzentration ca. 50 bzw. 25 mM betrug. Nach Asquith et al. (1974) genügen bereits Konzentrationen von unter 1 mM, mit 4 mM kann in vitro die maximale Dosismodifikation erreicht werden. Die meisten Versuche in vivo wurden an soliden Tumoren ausgeführt, die Tumorkonzentration des Medikaments erreichte dabei natürlich nicht dieselben Werte wie bei der von uns getesteten Versuchsanordnung. - Obwohl wir in den Kontrollversuchen keine direkte

Medikamentwirkung nachweisen konnten, könnte dennoch die ca. 25-30minütige Einwirkung von Ro o7-o582 in der verabreichten hohen Konzentration den intrazellulären Stoffwechsel der Asciteszellen beeinflusst haben, sei es im Sinne eines veränderten Elektronentransportmechanismus, welcher infolge Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung bei aeroben Zellen zu einer ATP-verarmung führt, oder in einer Verminderung des intrazellulären Pools von reduzierenden Aequivalenten. Solchermassen "vorbehandelte" Zellen sind infolge Beeinträchtigung ihres Repairvermögens strahlensensibel, es manifestieren sich auch latente Strahlenschäden (Fritz-Niggli, 1968). Der strahlensensibilisierende Effekt von Ro o7-o582 würde sich demzufolge nicht nur allein auf die sauerstoffimitierende Wirkung bei den Primärvorgängen nach Absorption der Strahlenenergie beschränken. Die Strahlenempfindlichkeit könnte auch erhöht werden durch Beeinflussung des Repairvermögens, wobei nicht nur gezielt hypoxische sondern auch aerobe Zellen betroffen wären.

Die vorliegende Arbeit lässt viele Fragen offen. Eine Wiederholung unter modifizierten Versuchsbedingungen drängt sich auf (volle Oxygenierung des Ascitestumors, kleinere Medikamentdosis, eventuelle Variation der Zeitintervalle bei den einzelnen Behandlungen). Die metabolischen Veränderungen, welche durch Ro o7-o582 hervorgerufen werden, dürfen aber auf keinen Fall vernachlässigt werden, sie können unter Umständen die Strahlenwirkung entscheidend beeinflussen. Unter Bezugnahme auf die klinische Anwendung sei nur verwiesen auf die viel längere Halbwertzeit von Ro o7-o582 beim Menschen (10-18 h im Vergleich zu 1-1½ h bei der Maus). Bei der längeren Kontaktzeit bekommt die Interferenz mit dem zellulären Metabolismus ein besonderes Gewicht, vor allem auch in Hinblick auf unerwünschte Nebenwirkungen am normalen Gewebe.

Zusammenfassung

Die strahlensensibilisierende Wirkung von Ro o7-o582 wurde anhand der Proliferationsfähigkeit von Ehrlich Ascites Tumorzellen in vivo nach einmaliger Röntgenbestrahlung untersucht. Eine Analyse der Regression normaler Zellen (Behandlung des lebenden Tiers unter Luftatmung) und künstlich anoxischer Zellen (Behandlung des 1 h zuvor abgetöteten Tiers) sollte abklären, ob der dem Medikament zugeschriebene, alleinig hypoxische Zellen sensibilisierende Effekt bestätigt werden kann. In unseren Untersuchungen zeigte Ro o7-o582 eine ganz ausgeprägte strahlensensibilisierende Wirkung, welche aber in praktisch gleichem Ausmass sowohl unter aeroben als auch unter "anoxischen" Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Die Strahlenschädigung der nur bestrahlten aeroben Zellen wurde dabei um ein Vielfaches übertroffen. Unsere Ergebnisse stimmen nicht mit der in der Literatur beschriebenen, spezifisch hypoxische Zellen sensibilisierenden Wirkung überein. Es werden Erklärungsmöglichkeiten für unsere Resultate diskutiert und der mögliche Wirkungsmechanismus des Medikaments beschrieben. Es ist einerseits nicht auszuschliessen, dass der von uns untersuchte Ascitestumor unter aeroben Verhältnissen hypoxische Zellen enthält, andererseits könnte Ro o7-o582 aber durch die Hemmung des Repairvermögens auch bei aeroben Zellen zu einer verstärkten Strahlenwirkung führen, indem es durch Interferenz mit dem zellulären Elektronentransportmechanismus den Energiestoffwechsel der Zelle zu beeinflussen vermag.

Behandlung (Anzahl Tiere)	Zellzahl (± Standardabw.)	95% Vertrauens-bereich
Ko/Luft (9)	$328.10^6 \pm 48.10^6$	$(291 - 364).10^6$
Ko/Anoxie (9)	$300.10^6 \pm 42.10^6$	$(267 - 332).10^6$
Ko/Ro/Luft (8)	$294.10^6 \pm 51.10^6$	$(251 - 337).10^6$
Ko/Ro/Anoxie (10)	$320.10^6 \pm 81.10^6$	$(262 - 378).10^6$

Tab. 1 Effekt der 1 h dauernden Anoxie und der 20minütigen Einwirkung von 0,67 mg/g Ro o7-o582 auf die Proliferationsfähigkeit von Ehrlich Ascites Zellen.

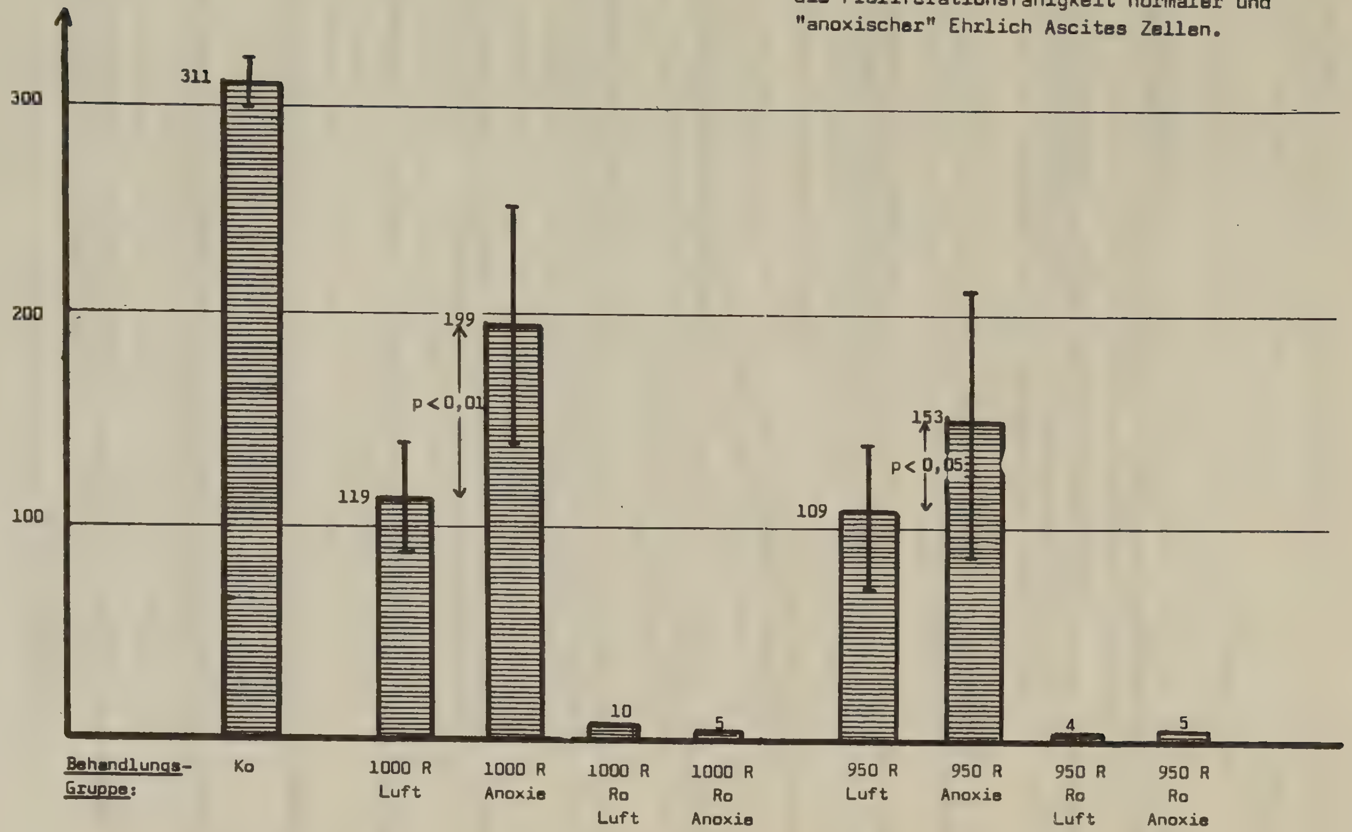
Behandlung (Anzahl Tiere)	Zellzahl (± Standardabweichung)	95% Vertrauensbereich	in % des Kontrollwertes	Signifikanz im t-Test
1000/Luft (33)	$119.10^6 \pm 26.10^6$	$(110-128).10^6$	36%	$p < 0{,}01$
1000/Anoxie (28)	$199.10^6 \pm 57.10^6$	$(176-220).10^6$	61.5%	
1000/Ro/Luft (10)	$10.10^6 \pm 2.10^6$	$(5.5 - 15).10^6$	3%	
1000/Ro/Anoxie (10)	$5.10^6 \pm 1{,}5.10^6$	$(3.5 - 6).10^6$	1,5%	

Tab. 2 Effekt der einmaligen Röntgenbestrahlung mit 1000 R unter aeroben bzw. "anoxischen" Bedingungen ohne oder nach Applikation von 0,67 mg/g Ro o7-o582 auf die Proliferationsfähigkeit von Ehrlich Ascites Zellen.

Behandlung (Anzahl Tiere)	Zellzahl ($\pm$ Standardabweichung)	95% Vertrauens-bereich	Signifikanz im t-Test
950/Luft (34)	$109.10^6 \pm 35.10^6$	$(97-122).10^6$	$p < 0,05$
950/Anoxie (18)	$153.10^6 \pm 60.10^6$	$(123-183).10^6$	
950/Ro/Luft (20)	$4.10^6 \pm 2.10^6$	$(3 - 5).10^6$	
950/Ro/Anoxie (19)	$5.10^6 \pm 2.10^6$	$(4 - 6).10^6$	

Tab. 3 Effekt der einmaligen Bestrahlung mit 950 R unter aeroben bzw. "anoxischen" Bedingungen ohne oder nach Applikation von 0,35 mg/g Ro o7-o582 auf die Proliferationsfähigkeit von Ehrlich Ascites Zellen.

<u>Fig. 1</u> Effekt der einmaligen Röntgenbestrahlung und der Behandlung mit Ro o7-o582 auf die Proliferationsfähigkeit normaler und "anoxischer" Ehrlich Ascites Zellen.



Literatur

Adams, G.E. and Dewey, D.L.: Hydrated electrons and radiobiological sensitisation. Biochem.Biophys.Res.Comm. 12, 473-477 (1963)

Adams, G.E., Asquith, J.C., Dewey, D.L., Foster, J.L., Michael, B.D., Willson, R.L.: Electron affinic sensitization. II. Paranitroacetophenone: a radiosensitizer for anoxic bacterial and mammalian cells. Int.J.Radiat.Biol. 19, 575-585 (1971)

Adams, G.E.: Chemical radiosensitization of hypoxic cells. Br.Med.Bull. 29, 48-53 (1973)

Adams, G.E.: Molecular mechanisms of cellular radiosensitization and protection. In: Radiation Protection and Sensitization. (H.L. Moroson and M. Quintiliani Eds.) pp. 3-14. Taylor & Francis, London (1970)

Anderson, R.S. and Turkowitz, H.: The experimental modification of the sensitivity of yeast to Roentgen rays. Am.J.Radiol. 46, 537-542 (1941)

Asquith, J.C., Foster, J.L., Willson, R.L., Ings, R., McFadzean, J.A.: Metronidazole ("Flagyl"). A radiosensitizer of hypoxic cells. Br.J.Radiol. 47, 474-481 (1974)

Asquith, J.C., Watts, M.E., Patel, K., Smithen, C.E., Adams, G.E.: Electron affinic sensitization V: Radiosensitization of hypoxic bacteria and mammalian cells in vitro by some nitroimidazoles and nitropyrazoles. Radiat.Res. 60, 108-118 (1974)

Begg, A.C., Sheldon, P.W., Foster, J.L.: Demonstration of hypoxic cell radiosensitization in solid tumors by metronidazole. Br.J.Radiol. 47, 399-404 (1974)

Berry, R.J.: Hypoxic protection and recovery in tumour cells irradiated at low dose-rates and assessed in vivo. Br.J.Radiol. 41, 921-926 (1968)

Biaglow, J.E., Nygaard, O.F., Greenstock, C.L.: Electron transfer in Ehrlich ascites tumor cells in the presence of nitrofurans. Biochem.Pharm. 25, 393-398 (1976)

Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J.: Effectiveness of nitrofuran derivatives in sensitizing hypoxic mammalian cells to X-rays. Br.J.Radiol. 46, 623-630 (1973)

Chapman, J.D., Webb, R.G., Borsa, J.: Radiosensitization of mammalian cells by p-nitro-acetophenone. I. Characterization in asynchronous and synchronous populations. Int.J.Radiat.Biol. 19, 561-573 (1971)

Churchill-Davidson, I., Sanger, C., Thomlinson, R.H.: Oxygenation in radiotherapy. II. Clinical Application.
Br.J.Radiol. 30, 406-422 (1957)

Conger, A.D.: The effect of oxygen on the radiosensitivity of mammalian cells.
Radiology 66, 63-68 (1956)

Crabtree, H.G. and Cramer, W.: The action of radium on cancer cells. II. Some factors determining the susceptibility of cancer cells to radium.
11th scientific report on the investigations of the Imperial Cancer Research Fund. pp. 89-101, Taylor & Francis, London (1934)

Del Monte, U.: Changes in oxygen tension in Yoshida ascites hepatoma during growth.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 125, 853-856 (1967)

Denekamp, J. and Michael, B.D.: Preferential sensitization of hypoxic cells to radiation in vivo.
Nature New Biol. 239, 21-23 (1972)

Denekamp, J., Michael, B.D., Harris, S.R.: Hypoxic cell radiosensitization. Comparative test of some electron affinic compounds using epidermal cell survival in vivo.
Radiat.Res. 60, 119-132 (1974)

Denekamp, J. and Harris, S.R.: Test of two electronaffinic radiosensitizers in vivo using regrowth of an experimental carcinoma.
Radiat.Res. 61, 191-203 (1975)

Denekamp, J. et al.: The response of a transplantable tumor to fractionated irradiation. I. X-rays and the hypoxic cell radiosensitizer Ro o7-o582.
Radiat.Res. 66, 66-75 (1976)

Denekamp, J. et al.: The response of a transplantable tumor to fractionated irradiation. III. Fast neutrons plus the radiosensitizer Ro o7-o582.
Radiat.Res. 70, 425-432 (1977)

Deschner, E.E. and Gray, L.H.: Influence of oxygen tension on X-ray-induced chromosomal damage in Ehrlich ascites tumor cells irradiated in vitro and in vivo.
Radiat.Res. 11, 115-146 (1959)

Dewey, D.L.: Effect of oxygen and nitric oxid on radiosensitivity of human cells in tissue culture.
Nature, 186, 780-782 (1960)

Dische, S., Gray, A.J., Zanelli, G.D.: Clinical testing of the radiosensitizer Ro-o7-o582 (II). Radiosensitization of normal and hypoxic skin.
Clin.Radiol. 27, 159-166 (1976)

Dische, S., Saunders, M.I., Lee, M.E., Adams, G.E., Flockhart, I.R.: Clinical testing of the radiosensitizer Ro o7-o582: Experience with multiple doses.
Br.J.Cancer 35, 567-579 (1977)

Duncan, W.: Exploitation of the oxygen enhancement ratio in clinical practise.
Br.Med.Bull. 29, 33-38 (1973)

Ebert, M.: H_2O_2-Bildung durch ionisierende Strahlung und deren Bedeutung für die Strahlenbiologie.
Strahlentherapie 97, 71-74 (1955)

Ebert, M.: Strahlenchemie des Wassers, ein Wegweiser der Strahlenbiologie. Angewandte Chem. 67, 169-188 (1955)

Elkind, M.M. and Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. Radiat.Res. 13, 556-593 (1960)

Field, S.B.: An historical survey of radiobiology and radiotherapy with fast neutrons In: Current Topics in Radiation Research (M. Ebert and A. Howard Eds.) vol. 11, pp. 1-86. North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1976)

Fowler, J.F., Morgan, R.L., Wood, C.A.P., Thomlinson, M.B., Hornsey, S., Silini, G., Alper, T. et al.: Pre-therapeutic experiments with the fast neutron beam from the Medical Research Council cyclotron. Br.J.Radiol. 36, 77-121 (1963)

Fowler, J.F. and Adams, G.E.: The impact of radiosensitizers of hypoxic cells. In: High Energy Photons and Electrons. Clinical Applications in Cancer Management. (S. Kramer, N. Suntharalingam, G.F. Zinninger Eds.) pp. 311-320. Wiley, New York (1976)

Fritz-Niggli, H.: Die Bedeutung des Repairsystems für die relative biologische Wirksamkeit von Strahlen verschiedener Qualität; eine Zwei-System-Theorie. Strahlentherapie 135, 202-212 (1968)

Fritz-Niggli, H. and Michel, Chr.: Chemical sensitization of the damaging effects on embryos produced by low radiation doses: the role of energy metabolism and immediate repair. In: Radiation Protection and Sensitization. (H.L. Moroson and M. Quintiliani Eds.) pp. 311-317. Taylor & Francis, London (1970)

Gray, L.H., Conger, D., Ebert, M., Hornsey, S., Scott, O.C.A.: Concentration of oxygen dissolved in tissues at time of irradiation as a factor in radiotherapy. Br.J.Radiol. 26, 638-648 (1953)

Gray, L.H.: Radiobiological basis of oxygen as modifying factor in radiation therapy. Am.J.Roentgenol. 85, 803-815 (1961)

Hall, E.J. and Roizin-Towle, L.: Hypoxic sensitizers: Radiobiological studies at the cellular level. Radiology 117, 453-457 (1975)

Hall, E.J. and Biaglow, J.E.: Ro o7-o582 as a radiosensitizer and cytotoxic agent. Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys. 2, 521-530 (1977)

Hall, E.J., Astor, M., Geard, C., Biaglow, J.E.: Cytotoxicity of Ro o7-o582: Enhancement by hyperthermia and protection by cysteamine. Br.J.Cancer 35, 809-815 (1977)

Hewitt, H.B. and Wilson, C.W.: Effect of tissue oxygen tension on radiosensibility of leukaemia cells irradiated in situ in livers of leukaemic mice. Br.J.Cancer 13, 675-684 (1959)

Hofer, K.G., Hofer, M.G., Ieracitano, J., McLaughlin, W.H.: Radiosensitization of hypoxic tumor cells by simultaneous administration of hyperthermia and nitroimidazoles. Radiat.Res. 70, 362-377 (1977)

Holthusen, H.: Beiträge zur Physiologie der Strahlenwirkung. Untersuchungen an Ascarideneiern.
Pflügers Archiv ges. Physiol. 187, 1-24 (1921)

Lala, P.K. and Patt, H.M.: Cytokinetic analysis of tumor growth.
Proc.Natl.Acad.Sci. 56, 1735-1742 (1966)

Lea, D.E.: The action of radiations on dilute aqueous solutions: the spatial distribution of H and OH.
Br.J.Radiol. Suppl. 1, 59-63 (1947)

Littbrand, B. and Révész, L.: The effect of oxygen on cell survival and recovery after irradiation.
Br.J.Radiol. 42, 914-924 (1969)

McNally, N.J.: The effect of a change in radiation quality on the ability of electron affinic sensitizers to sensitize hypoxic cells.
Int.J.Radiat.Biol. 29, 191-196 (1976)

Moore, B.A., Palcic, B., Skarsgaard, L.D.: Radiosensitizing and toxic effects of the 2-nitroimidazole Ro o7-o582 in hypoxic mammalian cells.
Radiat.Res. 67, 459-473 (1976)

Mottram, J.C.: A factor of importance in the radiosensitivity of tumors.
Br.J.Radiol. 9, 606-614 (1936)

Olive, P.L. and McCalla, D.R.: Cytotoxicity and DNA damage to mammalian cells by nitrofurans.
Chem.Biol.Interactions 16, 223-233 (1977)

Pohlit, W.E.: A biophysical model for radiation therapy.
In: High Energy Photons and Electrons. Clinical Applications in Cancer Management. (S. Kramer Ed.) pp. 321-332. Wiley, New York (1976)

Rao, K.R.: Radiosensitization and radioprotection studies on Ehrlich ascites tumor I: The cell generation cycle of a hypertriploid strain of the tumor under normal conditions.
Strahlentherapie 145, 197-202 (1973)

Rauth, A.M., Kaufman, K., Thomson, J.E.: In vivo testing of hypoxic cell radiosensitizers.
Radiat.Res.; Biomed. Chem. and Phys. Perspectives. pp. 761-772. Academic Press, New York (1975)

Sheldon, P.W., Foster, J.L., Fowler, J.F.: Radiosensitization of C3H-mouse mammary tumors by a 2-nitroimidazole drug.
Br.J.Cancer 30, 560-565 (1974)

Streffer, C.: Biologische Grundlagen der Strahlentherapie.
In: Strahlentherapie. Radiologische Onkologie. (E. Scherer Ed.) pp. 172-230. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1976)

Tannock, I.F.: A comparision of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumors.
Cancer Res. 29, 1527-1534 (1969)

Thoday, J.M. and Read, J.: Effect of oxygen on the frequency of chromosome aberrations produced by X-rays.
Nature 160, 608 (1947)

Thomlinson, R.H. and Gray, L.H.: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy.
Br.J.Cancer, 9, 539-549 (1955)

Thomlinson, R.H.: Changes in oxygenation in tumours in relation to irradiation.
In: Frontiers of Radiation Therapy and Oncology. vol. 3. (J.M. Vaeth Ed.) pp. 109-121. S. Karger Verlag, Basel (1968)

Thomlinson, R.H., Dische, S., Gray, A.J., Errington, L.M.: Clinical testing of the radiosensitizer Ro o7-o582 (III): Response of tumors.
Clin.Radiol. 27, 164-174 (1976)

Tubiana, M.: The kinetics of tumour cell proliferation and radiotherapy.
Br.J.Radiol. 44, 325-347 (1971)

Warburg, O.: Ueber die Entstehung der Krebszellen.
Naturwiss. 42, 401-406 (1955)

Wardmann, P.: The use of nitroaromatic compounds as hypoxic cell radiosensitizers.
In: Current Topics in Radiation Research. vol. 11. (M. Ebert and A. Howard Eds.) pp. 347-398. North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1977)

Weiss, J.: Radiochemistry of aqueous solutions.
Nature 153, 748-750 (1944)

Curriculum vitae

Am 13. April 1943 wurde ich in Zürich geboren. Die Primarschule besuchte ich in Zollikon ZH und anschliessend das Gymnasium an der Töchterschule der Stadt Zürich. Nach bestandener Maturitätsprüfung vom Typ B immatrikulierte ich mich im Herbst 1962 an der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich. Im Frühjahr 1969 schloss ich mein Studium mit dem eidgenössischen Staatsexamen ab. Infolge Mutterpflichten verzichtete ich vorerst auf eine regelmässige Berufsausübung. Die vorliegende Arbeit ist für mich ein erster Schritt zu ihrer Wiederaufnahme.

Frau Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli möchte ich für das Interesse und die kritische Stellungnahme beim Lesen des Manuskripts herzlich danken. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. K.R. Rao für die Ueberlassung des Themas und die hilfreiche Ermunterung sowie Frl. V. Gut für die wertvolle technische Hilfe.

Ich möchte an dieser Stelle meine Dankbarkeit auch meinen Eltern bezeugen, die es mir durch ihre moralische und finanzielle Hilfe ermöglicht haben, das Medizinstudium zu vollenden. Meinem Mann danke ich für viele anregende Diskussionen, welche mein Interesse auf das Gebiet der Strahlenbiologie lenkten, und die grosszügige Unterstützung während der Dauer dieser Arbeit.